

УДК 576.314:577.3

Ю. Д. Холодова

АТФ-ЗАЛЕЖНЕ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ІОНІВ У МЕМБРАННИХ ФРАГМЕНТАХ

(Аналіз у термінах іонообмінних властивостей мембран)

Дослідження процесів зв'язування іонів Са, К і На мембранними утвореннями в АТФ-залежних процесах іонного транспорту, здійснюваних з допомогою АТФаз, активованих цими іонами, дуже істотне для розуміння механізмів активного транспорту.

Ми розглянули процеси АТФ-залежного зв'язування іонів мембранними фрагментами скелетних м'язів жаби (M_I — фрагменти саркоплазматичного ретикулуму, M_{II} — фрагменти сарколеми і мембран ретикулуму) і зробили спробу проаналізувати їх у термінах вивчених раніше іонообмінних властивостей цих фрагментів [4, 6]. Методика проведення дослідів в загальних рисах не відрізнялася від описаної раніше [4, 6]. На рис. 1 (1, 2) наведено дані по вбиранню іонів Са фракцією M_I у присутності АТФ і без нього. Інкубаційне середовище містило Са в концентраціях 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 20 мМ/л; 2 мМ Mg, трис буфер (рН 7,2). АТФ (1 мМ) дозували безпосередньо перед центрифугуванням. Як видно з рис. 1, криві вбирання Са в присутності АТФ досягають насичення при малих ($\sim 0,5$ мМ/л) концентраціях Са в розчині, тоді як для досягнення насичення у відсутності АТФ необхідна концентрація Са 6—8 мМ/л. При цьому рівень вбирання Са в обох випадках однаковий. Присутність АТФ не змінювала концентрації вільного Са, оскільки нуклеотиди в умовах наших дослідів існували, головним чином, у вигляді Mg АТФ [9]. Прикладання закону дії мас до аналізу цих даних та їх вираз в координатах $\frac{1}{[CaR]} = f \frac{1}{f_{Ca}[Ca^{2+}]}$, аналогічне попередньому [4, 6], дає пряму лінію, нахил і перетинання якої з віссю ординат дозволяє обчислити максимальну ємкість і уявні константи процесів. Ці величини становлять:

Са	R^2-m , мекв/г білка	К, М/л
Са+АТФ	0,44	$1,93 \cdot 10^{-3}$
	0,43	$0,04 \cdot 10^{-3}$

Ці дані свідчать про значне збільшення спорідненості ретикулуму до іонів Са в присутності АТФ при постійній величині ємкості. Зменшені значення максимальної ємкості зв'язування, одержані в цій серії експериментів у порівнянні з попередніми [4], пояснюються вбиранням Mg, який не повністю заміщується Са в цих умовах. Додавання в середовище інкубації 100 мМ Na дозволяє одержати дані про те, що вбирання Са як у присутності, так і у відсутності АТФ здійснюється в обмін на ці іони і, отже, спостерігається конкуренція іонів Са і Na за ділянки зв'язування як у АТФ-залежному, так і АТФ-незалежному процесі (рис. 1, 3, 4). У відсутності Са вбирання Na досягає 0,28 мекв/г білка. Для заміщення Na на іони Са в присутності АТФ достатня його концентрація в розчині менше 0,1 мМ, тоді як у відсутності АТФ — до 4 мМ. На можли-

АТФ-залежне зв'язування іонів

вість конкуренції Са в АТФ-індукованих іонами, присутність яких захвату, є вказівки в літературі [1]. рН-залежність вбирання Са Mg (2 або 6 мМ), трис буфер (рН 7,2) відрізнялася від такої без АТФ (рис. 2), тоді як у відсутності АТФ

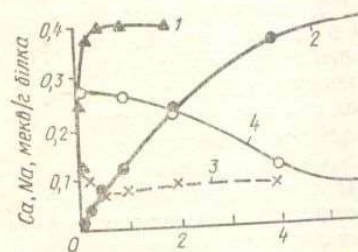


Рис. 1. Залежність вбирання іонів Са (1, 2) і Na (3, 4) в присутності (1, 3) і без (2, 4) АТФ від концентрації іонів Са у розчині. Концентрація іонів Na у розчинах 100 мМ.

вбирання із збільшенням рН інтерпретувати з точки зору іонного транспорту.

При вивченні одночасно вбирання Са саркоплазматичним ретикулумом, що АТФ-залежне, або, за термінологією [25], має оптимум при рН 6,4, і нахил кривої вбирання Са, Mg і К перевищує таку, що відповідає рівню насичення кальцієм ділянок з високою спорідненістю до Са. Це означає, що вбирання Са в присутності АТФ має оптимум при рН 6,4, і нахил кривої вбирання Са, Mg і К перевищує таку, що відповідає рівню насичення кальцієм ділянок з високою спорідненістю до Са. Це означає, що вбирання Са в присутності АТФ має оптимум при рН 6,4, і нахил кривої вбирання Са, Mg і К перевищує таку, що відповідає рівню насичення кальцієм ділянок з високою спорідненістю до Са.

Ще один факт, який вагається, — це відсутність вбирання Са в присутності АТФ при рН 7,2. Як видно з рис. 1, 6 мМ АТФ-індуковане вбирання Са (1, 2) відрізняється від такої без АТФ (3, 4). Залишається припустити, що вбирання Са в присутності АТФ здійснюється в обмін на ці іони і, отже, спостерігається конкуренція іонів Са і Na за ділянки зв'язування як у АТФ-залежному, так і АТФ-незалежному процесі (рис. 1, 3, 4). Підвищення концентрації вбирання Са (3), можливе зменшення концентрації в

вість конкуренції Са в АТФ-індукованому процесі захвату з одновалентними іонами, присутність яких не є необхідною для здійснення такого захвату, є вказівки в літературі [17, 18].

рН-залежність вбирання Са з середовища, що містить Са (0,25 мМ), Mg (2 або 6 мМ), трис буфер (рН 5—8) у присутності АТФ (1 або 3 мМ), відрізнялася від такої без АТФ і мала оптимум в інтервалі рН 5,8—7,0 (рис. 2), тоді як у відсутності АТФ спостерігалось монотонне збільшення

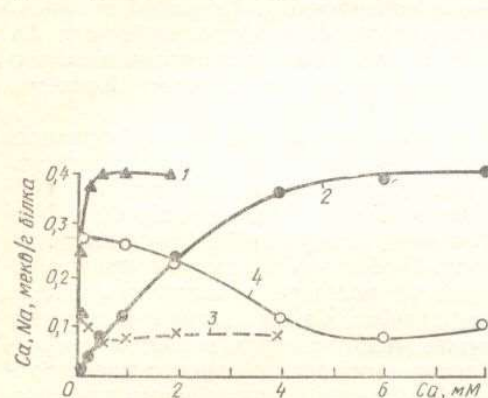


Рис. 1. Залежність вбирання іонів Са (1, 2) і Na (3, 4) в присутності (1, 3) і без АТФ (2, 4) від концентрації іонів Са у розчинах (концентрація іонів Na у розчинах 100 мМ).

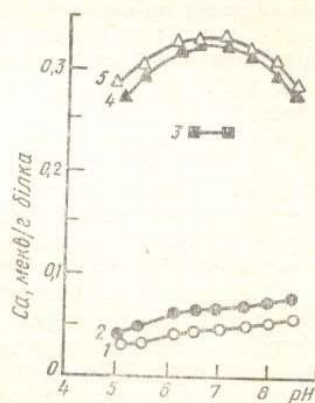


Рис. 2. Залежність вбирання іонів Са від рН розчинів.

1 — Са 0,25, Mg 6 мМ; 2 — Са 0,25, Mg 2 мМ; 3 — Са 0,25, Mg 2, АТФ 3 мМ; 4 — Са 0,25, Mg 2, АТФ 1 мМ; 5 — Са 0,25, Mg 6, АТФ 1 мМ.

вбирання із збільшенням рН. Наявність одержаного оптимуму важко інтерпретувати з точки зору іонообмінних уявлень.

При вивченні одночасно Са, Mg, К конкуренції і рН залежності вбирання Са саркоплазматичним ретикуломом м'язів кролика показано [9], що АТФ-залежне, або, за термінологією авторів, активне зв'язування Са, має оптимум при рН 6,4, і нижче цього рівня рН сума ввібраних катіонів Са, Mg і К перевищує таку у відсутності АТФ завдяки додатковому заміщенню кальцієм ділянок зв'язування іонів водню. Це ще раз свідчить про збільшення спорідненості іонів Са в присутності АТФ. При рН 6,2 максимальна ємкість вбирання Са, Mg і К була однаковою як у присутності, так і у відсутності АТФ, що, на думку авторів, свідчило про те, що АТФ не створює нових ділянок зв'язування для Са, а також не продукує такого захвату Са, який не був би зв'язаний із звільненням однакової кількості еквівалентів Mg і К.

Ще один факт, який важко інтерпретувати з точки зору іонообмінних уявлень, — це відсутність впливу збільшення концентрації Mg на вбирання Са в присутності АТФ. Аналогічний ефект описаний в літературі [25]. Як видно з рис. 2, при підвищенні концентрації Mg від 2 до 6 мМ АТФ-індуковане вбирання Са не змінюється, або дещо збільшується (4, 5), тоді як вбирання Са у відсутності АТФ при цьому вірогідно знижується внаслідок конкуренції іонів Mg і Са за ділянки зв'язування (1, 2). Залишається припустити, що збільшення спорідненості до Са усуває можливу конкуренцію Mg в досліджуваних інтервалах концентрацій. Підвищення концентрації АТФ до 3 мМ приводить до зменшення вбирання Са (3), можливо, внаслідок комплексування його з АТФ і зменшення концентрації вільних іонів у розчині. Відомо, що АТФ має

високу спорідненість до Mg і Ca і дає з ними стійкі комплекси [21], тоді, як спорідненість АТФ до одновалентних катіонів дуже низька [20].

Отже, аналіз даних проведених дослідів з точки зору іонообмінних уявлень дозволяє припустити збільшення спорідненості до іона Са під впливом АТФ, в результаті чого Са вбирається і ефективно конкурує з іншими іонами у відносно низьких концентраціях, а також використання в процесі АТФ-індукованого зв'язування Са іоногенних ділянок його неспецифічного зв'язування (Na—Са конкуренція). Одержані аномальні з точки зору іонообмінних уявлень дані по рН-залежності вбирання Са в присутності АТФ можуть бути свідченням того, що збільшення спорідненості до Са під впливом АТФ залежить від умов процесу, зокрема, величини рН.

Крім припущеного збільшення спорідненості ділянок зв'язування, одержані дані про зв'язування Са в АТФ-індукованому процесі можуть бути задовільно інтерпретовані, виходячи з уявлень про те, що АТФ індукує захват Са до такої міри, що збільшена концентрація Са у фазі мембран стає достатньою для ефективної конкуренції з іонами, що займають ділянки зв'язування мембран. В обох цих випадках вбирання Са повинно значно збільшуватися, що виявляється у величинах уявних констант, які характеризують спорідненість Са до вбирача. В другому випадку, очевидно, якщо розрахунок констант вести, виходячи з ефективної концентрації Са в інтерміцелярному просторі, процес має характеризуватися константами, що порівнюються з розрахованими в процесі вбирання Са без АТФ. Для перевірки цього припущення ми визначили максимальну концентрацію вільного Са при АТФ-індукованому захваті з розчину 0,25 мМ Са в розрахунку на воду саркоплазматичного ретикулу, враховуючи втрати Са при двох промиваннях сахарозою. Ця величина становила $4,8 \pm 0,2$ мМ. В разі неспецифічного зв'язування кількість зв'язаних іонів при такій концентрації, згідно з рівнянням $[MR] =$

$$\frac{f_m [M^+] [R_m^-]}{K + f_m [M^+]} [4, 6],$$
 з використанням розрахованих констант і максимальної ємності (або виходячи з рис. 1), має становити 0,35 мекв/г білка. Однак АТФ-індуковане зв'язування Са в цих умовах становило 0,43 мекв/г білка. Отже, очевидно, спорідненість Са до ділянок зв'язування в АТФ-індукованому процесі повинна бути дещо більшою, ніж одержувана у припущенні про неспецифічне зв'язування Са при його ефективній збільшеній концентрації у везикулах ретикулу внаслідок АТФ-індукованого захвату. Наші спроби підтвердити це положення шляхом розрахунку енергій активації процесів зв'язування Са в АТФ-індукованому процесі і порівняння їх з такими для неспецифічного зв'язування Са не мали успіху у зв'язку із значною початковою швидкістю АТФ-індукованого процесу і важкістю точного визначення енергії активації при даному методичному підході.

Аналіз літературних даних дозволяє виявити деякі відмінності в стані неспецифічно зв'язаного і зв'язаного в АТФ-індукованому процесі Са. Досліджуючи обмінюваність Са, зв'язаного в цих двох процесах на ^{45}Ca , Карвалло [8] встановив, що в першому випадку близько 50% Са, зв'язаного ретикулом, не обмінюється на ^{45}Ca середовища; в іншому випадку процент Са, що не обмінюється, перевищує 70.

Отже, слід вважати, що АТФ-індуковане зв'язування Са з мембранними фрагментами, яке спостерігається в результаті енергозалежного активного транспорту Са, може супроводжуватись збільшенням спорідненості неспецифічних ділянок зв'язування до іона Са. Це збільшення спорідненості спостерігається внаслідок часткового гідролізу і зв'язуван-

ня АТФ з мембраною та виникає переходів мембран [8, 12, 16]. зв'язується 50—200 іонів Са [1] молекули АТФ впливає відразу

Наші спроби виявити вплив Са, Mg і АТФ методом [5] в умовах цих дослідів пня в значеннях рК і ємності дея Са і Mg без АТФ само по се реєстрованих ділянок (табл. 1 викликало зменшення кілько ділянки D і деяке збільшення. Додавання АТФ сприяло да ксильних груп, очевидно, за р Однак пропорційність у додат кованому процесі і зменшенн супроводжують цей процес, від

Максимальна ємність ділянок зв'язування Са до ділянок дисоціації (рК) фрагментів саркоплазматичного ретикулу

Ділянка	рК	
	R_m	M_I
A	$0,25 \pm 0,06$	$6,37 \pm 0,06$
B	$0,11 \pm 0,02$	$5,61 \pm 0,06$
C	$0,13 \pm 0,04$	$4,81 \pm 0,06$
D	$0,59 \pm 0,09$	$3,40 \pm 0,06$
Сумарна ємність	$1,08 \pm 0,16$	

Очевидно, зменшення р при додаванні солей Са і Mg цими іонами, що приводить кул (збільшення кількості α -карбоксилів і демаскування з їх блокуванням іонами Са, що не може бути заміщена ньому випадку, очевидно, аміногруп у лужній ділянці. Цікаво відзначити, що при з використанням аніонних іонних груп у мембранах, які мікрооточення негативно з

Незначне зниження к одержане нами в АТФ-інд кість зв'язаного Са при тій но збільшена), добре корел ність АТФ у середовищі, з Са, з іншого, забезпечує С такий Са може не викли

ня АТФ з мембраною та виникаючих в результаті цього конформаційних переходів мембран [8, 12, 16]. Відзначається, зокрема, що на 1 М АТФ зв'язується 50—200 іонів Са [12], тобто взаємодія з мембраною однієї молекули АТФ впливає відразу на багато ділянок зв'язування.

Наші спроби виявити можливі модифікації іоногенних груп при впливі Са, Mg і АТФ методом потенціометричного титрування аналогічно [5] в умовах цих дослідів привели до реєстрації вірогідного зрушення в значеннях рК і ємкості деяких ділянок зв'язування. Однак, додавання Са і Mg без АТФ само по собі викликало ефект зміщення рК і ємкості реєстрованих ділянок (табл. 1). За даними табл. 1, дозування Са і Mg викликало зменшення кількості титрованих α -карбоксильних груп в ділянці D і деяке збільшення бокових карбоксильних груп в ділянці С. Додавання АТФ сприяло дальшому зменшенню титрованих α -карбоксильних груп, очевидно, за рахунок додаткової кількості зв'язаного Са. Однак пропорційність у додатковій кількості зв'язаного Са в АТФ-індукованому процесі і зменшенні титрованих α -карбоксильних груп, що супроводжують цей процес, відсутня.

Таблиця 1

Максимальна ємкість ділянок зв'язування (R_m , мекв/г білка) і уявні константи дисоціації (рК) фрагментів саркоплазматичного ретикулуму (M_1) за даними водневого титрування

Ділянка	R_m	рК	R_m	рК	R_m	рК
	M_1		$M_1 + \text{Са } 1 \text{ мМ}$	$\text{Mg } 2 \text{ мМ}$	$M_1 + \text{Са } 1 \text{ мМ}, \text{ Mg } 2 \text{ мМ}, \text{ АТФ } 1 \text{ мМ}$	
A	0,25±0,06	6,37±0,09	0,28±0,04	6,51±0,09	0,30±0,03	6,48±0,07
B	0,11±0,02	5,61±0,09	0,13±0,02	5,69±0,10	0,14±0,01	5,71±0,08
C	0,13±0,04	4,81±0,07	0,18±0,02	4,91±0,06	0,20±0,03	4,89±0,05
D	0,59±0,09	3,40±0,10	0,45±0,07	3,60±0,07	0,41±0,05	3,60±0,05
Сумарна ємкість	1,08±0,16		1,04±0,14		1,05±0,16	

Очевидно, зменшення кількості титрованих α -карбоксильних груп при додаванні солей Са і Mg зв'язане з їх необоротною модифікацією цими іонами, що приводить до збільшення полідисперсності макромолекул (збільшення кількості бокових карбоксильних груп), маскування α -карбоксилів і демаскування імідазольних та фосфорнокислих груп, або з їх блокуванням іонами Са, частина яких зв'язується настільки міцно, що не може бути заміщена воднем при дальшому титруванні. В останньому випадку, очевидно, слід було б чекати збільшення титрованих аміногруп у лужній ділянці, які вже не нейтралізуються карбоксильними. Цікаво відзначити, що при дослідженнях зв'язування Са мембранами з використанням аніонних барвників була показана поява нових катіонних груп у мембранах, яка в ряді випадків супроводжується змінами мікрооточення негативно заряджених груп, що зв'язують Са [2, 3].

Незначне зниження кількості титрованих α -карбоксильних груп, одержане нами в АТФ-індукованому процесі зв'язування Са (де кількість зв'язаного Са при тій же концентрації в зовнішньому розчині значно збільшена), добре корелює з встановленим фактом про те, що присутність АТФ у середовищі, збільшуючи, з одного боку, кількість зв'язаного Са, з іншого, забезпечує більшу його лабільність [8]. Внаслідок цього такий Са може не викликати істотних змін у титрованих іоногенних

групах і легко замінюються воднем у процесі титрування. Кількість титрованих груп в результаті істотно не змінюється. Можливо, конформаційні зрушення, індуковані АТФ, якщо такі є, відбуваються на рівні функціональних груп, які не титруються в умовах цих дослідів, або ці зрушення не можуть бути виявлені внаслідок їх маскування наступною лужною обробкою. В літературі є вказівки на можливі конформаційні зміни, обумовлені зв'язуванням АТФ у мембрані з втягненням SH-груп [13]. Принципова можливість модифікації іоногенних груп, індукованої АТФ в саркоплазматичному ретикулумі, була продемонстрована із застосуванням методу ЕПР [16].

Закінчуючи обговорення питання про АТФ-індуковане зв'язування Са мембранами саркоплазматичного ретикулуму, слід відзначити зростаючу кількість праць по виділенню та дослідженню білків ретикулуму. Тепер виявлено білки, що містять ділянки зв'язування Са як з високою (АТФаза, до складу якої входить білок-іонофор, Са-зв'язуючий білок М 55 000), так і з низькою спорідненістю (кальсеквестрин). Їх роль у структурі і функції саркоплазматичного ретикулуму обговорена в нещодавній статті [19].

Таблиця 2
Вбирання іонів Na мембранними фрагментами — M_{II} в АТФ-залежному процесі (середовище суспендування — трис HCl; об'єм суспензії — 3 мл)

№	Склад середовища (кінцеві концентрації компонентів, мМ/л)	Зміни активності в суспензії, мМ	Вибраний, Na, мкМ/г білка
I	MgCl ₂ — 1,8 Na ₂ АТФ — 3,3 (Na — 6,6)	-1,7±0,1	728
II	MgCl ₂ — 1,8 Na ₂ АТФ — 3,3 (Na — 6,6) KCl — 3,6	-1,2±0,2	514
III	MgCl ₂ — 1,8 Na ₂ АТФ — 3,3 (Na — 6,6) CaCl ₂ — 1,8	+0,3±0,1	-124 (виділилося в середовище)
IV	MgCl ₂ — 1,8 NaCl — 6,6	+0,2±0,1	-83 (виділилося в середовище)

Для дослідження АТФ-залежного зв'язування Na фракцією M_{II} , яка містила фрагменти сарколеми та мембран ретикулуму, були обрані умови, що забезпечували можливість реєстрації в суспензії мембранних фрагментів змін активності іонів Na селективними електродами. Вимірювання проводили на рН-метрі LBS-66 з використанням самописця Н-373-3. При дослідженні фракції M_{II} нам не вдалося зареєструвати вірогідних змін активності Na. В табл. 2 наведено дані про зміни реєстрованої активності іонів Na в сумішах Na₂ АТФ і MgCl₂ в присутності або без KCl при додаванні суспензії фракції M_{II} в трис HCl буфері (рН-7,2). Загальний об'єм суспензії 3 мл (8—15 мг білка). Облік впливу іонів K на Na електрод проводився шляхом контрольних вимірювань активності Na в середовищі суспензування в присутності іонів K і без них. Отже, в умовах даних експериментів, коли неспецифічне зв'язування іонів Na

у відсутності АТФ не реєструється суспензією. Виключення з середовища Na. Додавання іонів Са у відсутності АТФ не призводить до додаткового виділення його з суспензії, що пояснюється з точки зору конформаційних змін, які відбуваються під впливом АТФ.

Припущення про іоногенне зв'язування не суперечить одержаним раніше даним про АТФ-гідролізуючу систему, що звільняє Са з цього К-індукованого зв'язування і про оборотність зв'язування іонів Са, кож укладаються в уявлення про ренцію іонів за іоногенні дії.

На жаль, обраний метод дослідження змін активності в суспензії не дозволяє дослідити концентраційні зміни білків. Найбільш перспективним напрямком дослідження АТФ-індукованого зв'язування Na, на основі якого можна було б зробити висновок про іонообмінні процеси.

Рис. 3. Залежність вбирання іона Na мембранними фрагментами від концентрації АТФ у середовищі суспендування

цього зв'язування з використанням процесів. Однак нам вдалося одержати дані про залежність від концентрації АТФ зв'язування, які індукуються іонами Na, одержаними при вивченні мікросом мозку [15].

Порівняння одержаних даних з вбиранням Na (емкості зв'язування неспецифічного зв'язування за винятком того, що останні концентрації іонів у зовнішньому середовищі).

Заманливо припустити, що іонізація зв'язування Na іонообмінного зв'язування, модифікація зв'язування.

Ця модифікація дії АТФ на гідролізі АТФ, так і при зв'язуванні [22].

Характерно, що більша частка зв'язування іонів Na для АТФ [14, 22, 24] переходу реактивних форм іонів Na можливістю для підвищення емкості при АТФ-індукованому зв'язуванні Na іонообмінного зв'язування, модифікація зв'язування, що може бути збільшення ефекту зв'язування в просторі мікросом, що зазвичай пов'язано з одержаними для зв'язування показали, що мак

у відсутності АТФ не реєструється, додавання АТФ сприяє вбиранню Na суспензією. Виключення з середовища K збільшує специфічне вбирання Na. Додавання іонів Ca у відсутності K гальмує вбирання Na і сприяє додатковому виділенню його в середовище інкубації. Ці дані цілком пояснюються з точки зору конкуренції іонів за місця зв'язування, що виявляються під впливом АТФ.

Припущення про іоногенне походження специфічного зв'язування не суперечить одержаним раніше даним [1] щодо звільнення іонів Na АТФ-гідролізуючою системою у відповідь на додавання K та інгібування цього K-індукованого звільнення іонами Ca. Одержані авторами дані про оборотність зв'язування іонів Na також укладаються в уявлення про конкуренцію іонів за іоногенні ділянки.

На жаль, обраний метод реєстрації змін активності в суспензії не дає можливості дослідити концентраційну залежність АТФ-індукованого зв'язування Na, на основі якої можна було б робити висновок про іонообмінний характер

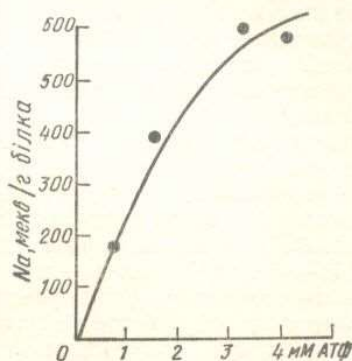


Рис. 3. Залежність вбирання іона Na (мкєв/г білка) від концентрації АТФ у середовищі інкубації.

цього зв'язування з використанням закону дії мас, як критерію оцінки процесів. Однак нам вдалося зареєструвати збільшення зв'язування Na залежно від концентрації АТФ (рис. 3) і показати, що цей процес характеризується насиченням. Отже, існує якесь кінцеве число ділянок зв'язування, які індукуються АТФ. Цей результат узгоджується з даними, одержаними при вивченні індукованого АТФ і Mg зв'язування Na на мікросомах мозку [15].

Порівняння одержаних нами характеристик АТФ-індукованих процесів вбирання Na (ємкість, конкурентність) з характеристиками процесів неспецифічного зв'язування [4, 6] свідчить про їх певну схожість за винятком того, що останні потребують для виявлення значно більших концентрацій іонів у зовнішніх розчинах.

Заманливо припустити, як і в попередньому випадку, що при АТФ-індукованому зв'язуванні Na можуть бути використані ділянки неспецифічного зв'язування, модифіковані АТФ і Mg із збільшенням спорідненості.

Ця модифікація ділянок може відбуватися як при частковому гідролізі АТФ, так і при зв'язуванні АТФ з АТФазою мембранних фрагментів [22].

Характерно, що більш міцне зв'язування АТФ відбувається у відсутності K; зв'язування K з ферментом значно зменшує спорідненість для АТФ [14, 22, 24]. Зміна спорідненості для АТФ є сигналом переходу реактивних форм активного центра фосфорилування. Ще однією можливістю для пояснення одержаного факта про близькі значення ємкості при АТФ-індукованому і неспецифічному зв'язуванні Na може бути збільшення ефективної концентрації Na у міжмолекулярному просторі мікросом, що забезпечує дальше неспецифічне зв'язування відповідно до одержаних для цього процесу [4] констант. Однак наші розрахунки показали, що максимальна концентрація ввбраного Na не може

забезпечити його зв'язування неспецифічним процесом, який потребує значно більшої концентрації. Кількість Na, що втрачається в результаті промивань у розчинах сахарози після його АТФ-індукованого зв'язування становила лише до 10% його загальної концентрації. Отже, можна вважати, що АТФ модифікує ділянки зв'язування, збільшуючи їх спорідненість до іонів Na.

Одержані дані по зв'язуванню іонів Na і Ca мембранними фрагментами в АТФ-залежних процесах становлять значний інтерес з точки зору аналізу припущення про наявність сполученості між зв'язуванням іонів і проявом ферментативної активності АТФ-гідролізуючих систем. Існування такої сполученості відзначено в ряді досліджень АТФ-залежних процесів зв'язування Na і захвату Ca [1, 12, 15, 25]. Однак чіткої кореляції між кількістю зв'язаних іонів (або кількістю звільнюваних іонів Na при додаванні в систему K) і кількістю включеного фосфату в проміжний фосфопротейн, а тим більш кількістю мінералізованих іонів фосфору не виявлено. Особливо показовий цей момент у наших дослідженнях АТФ-індукованого зв'язування Na, де величина виявленого зв'язування Na досить значна, і та її частина, яка забезпечується виключенням K з середовища інкубації (728—514=214 мкМ/г білка) порівнявана з розрахованою нами на підставі даних Лева і Писаревої [1] — 143—200 мкМ/г білка, — тим часом, як Na-K-залежна АТФазна активність в наших дослідях практично не виявляється. Дуже істотною обставиною, що обумовлює відсутність кореляції між кількістю іонів Na, що зв'язуються, і мінералізованих іонів фосфору, є труднощі у виявленні АТФазної активності в досліджуваному об'єкті [7, 11], а також багатостадійність процесу гідролізу АТФ і специфічність прояву кожної з його стадій, що впливають з розгляду можливих схем функціонування АТФазних систем [10, 23, 24, 26].

Висновки

Дослідження процесів залежного від енергії АТФ зв'язування іонів Na і Ca в мембранних фрагментах сарколеми та саркоплазматичного ретикулу скелетних м'язів жаби, а також їх аналіз у термінах іонообмінних властивостей мембранних фрагментів показали, що кількісні характеристики АТФ-індукованих процесів поглинання іонів можна порівняти з аналогічними характеристиками процесів неспецифічного зв'язування за винятком того, що перші потребують значно менших концентрацій іонів у зовнішніх розчинах. Формальне збільшення спорідненості іонів в АТФ-індукованих процесах пов'язане як з можливою модифікацією ділянок зв'язування з допомогою АТФ і Mg, так і зі збільшенням ефективної концентрації іонів у міжмолекулярному просторі мембранних фрагментів шляхом енергозалежного активного транспорту; збільшення концентрації забезпечує далі зв'язування іонів з неспецифічними іоногенними ділянками.

Методом потенціометричного титрування виявлене зрушення в значеннях рК і ємкості ділянок зв'язування фрагментів саркоплазматичного ретикулу під впливом іонів Ca за рахунок зменшення кількості титрованих α -карбоксильних груп. Додавання АТФ не приводило, однак, до істотної модифікації функціональних груп, титрованих в умовах дослідів.

Обговорено можливі причини відсутності сполученості між зв'язуванням іонів і гідролізом АТФ.

1. Лев А. А., Писарева Л. Н. В. мембранной АТФазой. — Цитол.
2. Левин С. В., Свиридов Б. I сомальных мембран. — Цитолог.
3. Пассова Р. Б., Левин С. I хова И. И. Распределение за нервов краба при вариации но Каунас, 2, 360.
4. Холодова Ю. Д. Фізико-хімі турях. — Укр. біохім. журн., 19
5. Холодова Ю. Д. Ионогенные скелетных мышц. — Биофизика
6. Холодова Ю. Д., Сорокин бранными фрагментами скелет
7. Bonting S. L. Caravaggi tassium-activated adenosine tri 413.
8. Carvalho A. P. Ca-binding and local anesthetic. — J. Gen. P
9. Carvalho A. P., Leo B. Effic fragmented sarcoplasmic reticu
10. Charnock J. S., Post R. L. cation activated adenosine triph
11. Duggan P. F. Some propo triphosphatase of frog sartoriu
12. Ebashi S., Lippman F. A fraction of rabbit muscle. — J.
13. Hasselbach W., Serayda through the sarcoplasmic mem
14. Hegyvary C., Post R. L. E sium ion-stimulated adenosine
15. Järnefelt J., von Steding binding system of rat brain n
16. Landgraf W. S., Inesi C belled sarcoplasmic reticulum
17. Lee K. S., Ranaba K., Yu activity of the microsomal g 1965, 179, 456.
18. Martonosi A., Feretos 239, 648, 659.
19. Mc Lennan D. H. Resolutio 1975, 53, 251.
20. Melchior N. S. Sodium an J. Biol. Chem., 1954, 208, 615.
21. Nanninga L. B. The associ Sr and Ba ions. — Biochem. I
22. Norby J. G., Jensen J. Bi Biophys. Acta, 1971, 233, 104.
23. Opit L. J., Charnock J. S. 208, 471.
24. Post R. L., Hegyvary C. kinetics of Na and K ion tra
25. Weber A., Herz R., Reis fragmented SR. — Biochem. I
26. Yamamoto T., Topom of SR from skeletal muscle. —

Інститут біохімії ім. О. В. Паладі
АН УРСР, Київ

Література

1. Лев А. А., Писарева Л. Н. Взаимодействие ионов Na и K в ходе гидролиза АТФ мембранной АТФазой. — Цитология, 1970, 12, 879.
2. Левин С. В., Свиридов Б. Е. Действие ионов Ca на свойства фракции микросомальных мембран. — Цитология, 1969, 9, 1259.
3. Пассова Р. Б., Левин С. В., Каулин А. Б., Гольфанд К. А., Марашова И. И. Распределение заряженных групп на белках плазматических мембран нервов краба при вариации ионного состава среды. — Биофизика мембран, 1973, Каунас, 2, 360.
4. Холодова Ю. Д. Фізико-хімічні основи зв'язування іонів в мембранних структурах. — Укр. біохім. журн., 1971, 43, 149.
5. Холодова Ю. Д. Ионогенные группы в мембранных фрагментах и миофибриллах скелетных мышц. — Биофизика, 1972, 17, 70.
6. Холодова Ю. Д., Сорокина З. А. Обменное поглощение ионов K и Na мембранными фрагментами скелетных мышц. — Биофизика, 1970, 15, 836.
7. Bonting S. L., Caravaggio L. L., Hawkins N. M. Studies on sodium, potassium-activated adenosine triphosphatase. IV. — Arch. Biochem. Biophys., 1962, 98, 413.
8. Carvalho A. P. Ca-binding properties of SR influenced by ATP, caffeine, quinine and local anesthetic. — J. Gen. Physiol., 1968, 52, 622.
9. Carvalho A. P., Leo B. Effect of ATP on the interaction of Ca, Mg and K with fragmented sarcoplasmic reticulum. — J. Gen. Physiol., 1967, 50, 1327.
10. Charnock J. S., Post R. L. Evidence of the mechanism of ouabain inhibition of cation activated adenosine triphosphatase. — Nature, 1963, 199, 910.
11. Duggan P. F. Some properties of the monovalent cation-stimulated adenosine triphosphatase of frog sartorius microsomes. — Biochem. Biophys. Acta, 1965, 99, 144.
12. Ebashi S., Lippman F. ATP-linked concentration of Ca ions in a particulate fraction of rabbit muscle. — J. Cell. Biol., 1962, 14, 389.
13. Hasselbach W., Seraydarian K. The role of sulfhydryl groups in Ca transport through the sarcoplasmic membranes of skeletal muscle. — Biochem. Z., 1966, 345, 159.
14. Hegyvary C., Post R. L. Binding of adenosine triphosphate to sodium and potassium ion-stimulated adenosine triphosphatase. — J. Biol. Chem., 1971, 246, 5234.
15. Järnefelt J., von Stedingk L. V. Some properties of the ATP dependent Na binding system of rat brain microsomes. — Acta Physiol. Scand., 1963, 57, 328.
16. Landgraf W. S., Inesi G. ATP-dependent conformational changes in «Spin labelled sarcoplasmic reticulum». — Arch. Biochem. Biophys., 1969, 130, 111.
17. Lee K. S., Ranaba K., Yu D. H. Studies on the ATPase, Ca uptake and relaxing activity of the microsomal granules from skeletal muscle. — J. Physiol. (London), 1965, 179, 456.
18. Martonosi A., Feretos R. Sarcoplasmic reticulum I, II. — J. Biol. Chem., 1964, 239, 648, 659.
19. McLennan D. H. Resolution of Ca transport system of SR. — Can. J. Biochem., 1975, 53, 251.
20. Melchior N. S. Sodium and potassium complexes of ATP; equilibrium studies. — J. Biol. Chem., 1954, 208, 615.
21. Nanninga L. B. The association constant of the complexes of ATP with Mg, Ca, Sr and Ba ions. — Biochem. Biophys. Acta, 1961, 54, 330.
22. Norby J. G., Jensen J. Binding of ATP to brain microsomal ATPase. — Biochem. Biophys. Acta, 1971, 233, 104.
23. Opił L. J., Charnock J. S. A molecular model for a sodium pump. — Nature, 1965, 208, 471.
24. Post R. L., Hegyvary C., Kume S. Activation by ATP in the phosphorylation kinetics of Na and K ion transport ATPase. — J. Biol. Chem., 1972, 247, 6530.
25. Weber A., Herz R., Reiss J. Study of the kinetics of Ca transport by isolated fragmented SR. — Biochem. Z., 1966, 345, 329.
26. Yamamoto T., Tonomura Y. Reaction mechanism of the Ca-dependent ATPase of SR from skeletal muscle. — J. Biochem., 1968, 64, 137.

Інститут біохімії ім. О. В. Паладіна
АН УРСР, Київ

Надійшла до редакції
30. X 1975 р.

Ju. D. Kholodova

ATP-DEPENDENT BINDING OF IONS IN MEMBRANE FRAGMENTS (ANALYSIS IN TERMS OF ION-EXCHANGE PROPERTIES OF MEMBRANES)

Summary

Studies in the ATP-energy dependent binding of Na and Ca ions in the membrane fragments of sarcolemma and sarcoplasmic reticulum of the frog skeletal muscles and its analysis in terms of ion-exchange properties of the membrane fragments showed that the quantitative characteristics of ATP-induced processes of ion binding are comparable with the analogous characteristics of the processes of nonspecific binding. The only difference is that the former demands considerably less concentrations of ions in external solutions. The observed formal increase of ions affinity in ATP-induced processes is connected with both possible modification of the binding sites by means of ATP and Mg and an increase in the effective concentration of ions in the intermolecular space of the membrane fragments by the energy-dependent active transport — an increase in the concentration provides for a subsequent binding of ions in the nonspecific ionogenic sites.

Shifts in the values of pK and capacity of the binding sites in the fragments of sarcoplasmic reticulum influenced by Ca ions due to a decrease in the amount of titrated α -carboxylic groups were found by the potentiometric titration method. Addition of ATP causes no essential modification in the functional groups titrated under conditions of the presented experiments.

The A. V. Palladin Institute of Biochemistry,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR,
Kiev

УДК 577.4:599.32.629.12

Л. М. Шаfran

АДАПТАЦІЙНІ ЗМІНИ ЕЛЕКТРОЛІТНОГО ОБМІНУ БІЛИХ ЩУРІВ, ЯКІ ПЕРЕЖИЛИ

В основі формування пристосованих впливів лежать зміни кринної системи, які, в кінцевому кінці, є шляхом. У зв'язку з цим зростає адаптація електродіти, розподілу цюнального стану нейро-ендокринної процесів внутріклітинного.

Незважаючи на порівняно в електродітного обміну в процес до дії різних несприятливих факторів, роль виробничих умов у так факторів специфічного середовища дослідженнях [3, 4, 10]. Ми ви адаптації організму до динамічних суднах у рейсах і при моделювання в умовах лабораторії.

Методи

Досліди провадилися на 95 без частини тварин перебувала на суднах. Дослідження проводилися на суховантажних суднах високих температур при плаванні в кліматичної зони в іншу, а також газів фактора (аміак). Тварин шодня манди, оскільки саме ця професійна група нішнього середовища в плаваннях. Реваж жилих суднових приміщень.

Дослідження вмісту електродіти в судна з рейсу. Враховуючи вплив ск на організм під час плавання, для вимірювання в лабораторних умовах, в процінних отруєнь аміаком у концентрації (32—34° С). Решту часу тварини пере температурою повітря 18—20° С. Для ристовували торф'яні підстилки. Годін

Щурів декапітували на 6, 14, 30, м'яному фотометрі типу ВПФ-ВТІ. Р виражали в міліеквівалентах на 1 л, лентях на 1 кг сирої тканини.

Резули

Дослідження показали, щ факторів зовнішнього середовища 40° С, шум, вібрація тощо у ла на суховантажних суднах, спо